

19



Europäisches Patentamt  
European Patent Office  
Office européen des brevets



11 Veröffentlichungsnummer: **0 543 178 A2**

12

## EUROPÄISCHE PATENTANMELDUNG

21 Anmeldenummer: **92118227.5**

51 Int. Cl.<sup>5</sup>: **C07K 15/06, A61L 25/00**

22 Anmeldetag: **24.10.92**

30 Priorität: **19.11.91 DE 4137996**

43 Veröffentlichungstag der Anmeldung:  
**26.05.93 Patentblatt 93/21**

84 Benannte Vertragsstaaten:  
**AT BE CH DE DK ES FR GB GR IE IT LI LU NL  
PT SE**

71 Anmelder: **BEHRINGWERKE  
Aktiengesellschaft  
Postfach 1140  
W- 3550 Marburg 1(DE)**

72 Erfinder: **Karges, Hermann E.  
Sonnenweg 32  
W- 3550 Marburg(DE)  
Erfinder: Naumann, Horst  
Hermannstrasse 26  
W- 3550 Marburg(DE)**

54 Verfahren zur Herstellung eines virussicheren Thrombinkonzentrates.

57 Es wird ein Verfahren beschrieben, das in einfacher Weise aus pasteurisierten Konzentraten des Prothrombinkomplexes ein virussicheres Thrombinkonzentrat zu gewinnen erlaubt, und seine Verwendung als Arzneimittel.

EP 0 543 178 A2

Die Erfindung betrifft ein Verfahren, das in einfacher Weise aus einer pasteurisierten Lösung eines Prothrombinkomplexes eine virussichere Thrombinpräparation herzustellen erlaubt.

Zur Gewinnung von Thrombin sind mehrere Verfahren beschrieben, die von einem partiell gereinigten Prothrombin ausgehen und dieses dann durch Zusatz von Gewebethromboplastin und Ca-Ionen in Thrombin umwandeln.

Auch Methoden zur Umwandlung eines ungereinigten Prothrombinkonzentrates in Thrombin durch hohe Salzkonzentrationen sind bekannt. Diese Umwandlung erfolgt nur, wenn alle Faktoren des Prothrombin-komplexes in ausreichender Menge im Gemisch vorhanden sind. Ein über einen Anionenaustauscher gereinigter Prothrombinkomplex läßt sich mit Salz aktivieren, wenn Autoprothrombin C (F X) zugesetzt wird. Auch die Anwesenheit von F VII ist wesentlich.

Bedingt durch die Gefahr mit Proteinen menschlichen oder tierischen Ursprungs Krankheitserreger viralen Ursprungs (z. B. Hepatitis, AIDS, BSE) zu übertragen, sind bei der Herstellung von Konzentraten, die solche Proteine enthalten, Inaktivierungsmaßnahmen für Pathogene erforderlich.

Für die Herstellung von Thrombin sind eine Reihe von Verfahren bekannt, die einen Inaktivierungsschritt für Pathogene enthalten, beispielsweise durch trockene Erhitzung.

Es sind auch Verfahren zur Virusinaktivierung in wässrigen Thrombinlösungen bekannt (DE 38 09 991).

EP 0 378 798, entsprechend DE 38 43 126, beschreibt ein Verfahren, bei dem der Prothrombinkomplex an einen Anionenaustauscher gebunden und mit Ca-Ionen, Gewebethromboplastin oder aktiviertem F Xa aktiviert wird.

Alle Verfahren, die zur Aktivierung des Prothrombinkomplexes Gewebethromboplastin benutzen, haben den Nachteil, daß dieses anschließend nicht entfernt werden kann und eine Quelle der Verunreinigung des Produktes darstellt.

Aktivierungen mit hohen Konzentrationen von Salzen, die Ca-Ionen komplexieren, wie Natrium-Citrat, haben den Vorteil, daß der Prothrombinkomplex nicht zusätzlich durch Gewebeproteine kontaminiert wird. Allerdings läßt sich ein über DEAE-Austauscher gereinigtes Prothrombinkonzentrat nicht zu Thrombin aktivieren, wenn man nicht aktivierten F X oder Gewebethromboplastin zusetzt. Es wäre auch vorteilhaft, die Virusinaktivierung bereits im Prothrombinkomplex durchzuführen, damit das im Vergleich zum Prothrombin labile Enzym Thrombin nicht den rauen Methoden der Virusinaktivierung ausgesetzt werden muß und durch Strukturumwandlungen an Nativität verliert.

Es wurde nun überraschenderweise gefunden, daß ein über Anionenaustauscher gereinigter und pasteurisierter Prothrombinkomplex durch Zugabe eines löslichen Salzes mit einem Anion, das mit Calcium ein schwerlösliches Salz oder einen löslichen Komplex bietet, in einer Konzentration von mindestens 0.5 mol/l zu Thrombin aktiviert werden kann, wenn der Ansatz eine katalytische Menge Thrombin enthält (Tab. 1, Spalte b). Ohne den Salzzusatz bewirkt die gleiche Thrombin-Menge nur eine ungenügende Aktivierung des Prothrombins (Tab. 2, Spalte c). Weiterhin ist die Aktivierung temperaturabhängig.

Gegenstand der Erfindung ist deshalb ein Verfahren zur Herstellung einer gereinigten und virussicheren Thrombin-Präparation, dadurch gekennzeichnet, daß einer Lösung eines über einen Anionenaustauscher gereinigten und einer Virus-Inaktivierung unterworfenen Prothrombin-Komplexes ein lösliches Salz mit einem Anion, das mit Calcium ein schwerlösliches Salz oder einen löslichen Komplex bildet, in einer Konzentration von mindestens 0.5 mol/l zugegeben und die Lösung mit einer katalytischen Menge Thrombin behandelt wird.

Die katalytische Menge Thrombin kann während des Reinigungsverfahrens entstanden sein kann. Andernfalls wird Thrombin zugesetzt.

Eine katalytische Menge Thrombin soll Thrombin in einer Konzentration von größer als Null bis 200, vorzugsweise 10 bis 50 Einheiten pro ml bedeuten.

Der Prothrombin-Komplex kann aus tierischem Plasma gewonnen sein.

Vorzugsweise wird ein über DEAE-Ionenaustauscher gereinigter Prothrombinkomplex, der beispielsweise nach EP 0 137 428 pasteurisiert wird, verwendet.

Anstelle einer Pasteurisierung können die Viren jedoch auch auf eine beliebige andere Weise inaktiviert werden.

Als calciumbindendes Anion wird vorzugsweise Sulfat-, Citrat-, Phosphat- oder Oxalat-Anion, besonders Citratanion, verwendet. Das entsprechende Salz, vorzugsweise ein Alkali- oder Ammoniumsalz wird in einer Konzentration von 0.5 mol/l bis zur jeweiligen Sättigungsgrenze verwendet.

Weitere bevorzugte Ausführungsformen sind dadurch gekennzeichnet, daß Prothrombinkomplex aus tierischem Plasma verwendet wird oder daß bei 0°C bis 50°C, vorzugsweise bei 28°C, mit Thrombin 2 - 100 Stunden, vorzugsweise 5 - 20 Stunden behandelt wird.

Mit dem erfindungsgemäßen Verfahren läßt sich auf einfache Weise ein natives, hochreines und virussicheres Thrombinkonzentrat herstellen, das als Haemostyptikum oder in einem Gewebekleber auf der Basis von Fibrinogen verwendet werden kann.

## 5 Beispiele

### Beispiel 1

16 ml pasteurisiertes Human-Prothrombinkonzentrat mit 65 E F II/ml wurden mit 20 E/ml Human-Thrombin und 4 g (25 % w/v) Tri-Natrium-Citrat versetzt und nach Einlösen des Salzes bei 28°C inkubiert. Nach verschiedenen Zeiten wurde die erhaltene Thrombinaktivität bestimmt (Tabelle 1, Spalte b), am Ende der Aktivierung das Citrat ausdialysiert und das Thrombin nach Stabilisierung und Einstellung der gewünschten Aktivität lyophilisiert.

Tabelle 1

Aktivierung von an Anionen - Austauschern gereinigten Prothrombinkomplex mit gesättigter Citratlösung in Abhängigkeit von der Temperatur			
Zeit (Std)	Thrombinaktivität (IE/ml) der Ansätze		
	a) bei 4°C	b) bei 28°C	c) bei 37°C
0	15	20	20
1	n.b.	61	63
3	13	350	1084
5	n.b.	1695	3351
10	18	5858	5141
21	n.b.	8492	7393
25	14	8978	6991
45	94	8109	7575
70	6800	n.b.*	n.b.
96	7700	n.b.	n.b.
Höchste Thrombinaktivität pro 1 IE F II		138	117

\*n.b. = nicht bestimmt

### Beispiel 2

18 ml pasteurisiertes Human-Prothrombinkonzentrat mit 65 E F II/ml wurden mit 20 E/ml Human-Thrombin und 4,5 g Tri-Natrium-Citrat versetzt und nach Einlösen des Salzes bei 37°C inkubiert. Nach verschiedenen Zeiten wurde die erhaltene Thrombinaktivität bestimmt (Tabelle 1, Spalte c).

### Beispiel 3

8 ml pasteurisiertes Human-Prothrombinkonzentrat mit 70 E F II/ml wurden mit 20 E/ml Humanthrombin/ml versetzt und ohne Zusatz eines Salzes mit calciumbindenden Anion bei 37°C inkubiert. Die nach verschiedenen Zeiten erhaltenen Thrombinaktivitäten sind in der Tabelle 2, Spalte c dargestellt.

### Beispiel 4

10 ml pasteurisiertes Human-Prothrombinkonzentrat mit 80 E F II/ml wurde ohne Zusatz von Thrombin mit 2,5 g Tri-Natrium-Citrat versetzt und nach dem Einlösen des Salzes bei 28°C inkubiert. Nach verschiedenen Zeiten wurden Proben entnommen und Thrombin-Aktivität bestimmt (Tabelle 2, Spalte b).

Tabelle 2

5	Aktivierung von an Anionen – Austauschern gereinigten Prothrombinkomplex in Abhängigkeit von der Spezies des Prothrombins, von Thrombinzusatz und Zusatz eines Salzes mit Ca – bindendem Anion			
	Thrombinaktivität (IE/ml) der Ansätze			
	Zeit (Std)	a) bov.Prothr., 28 ° C,Citr.	b)Citr.,ohne Thrombin, 28 ° C	c)Thrombin, ohne Citr., 37 ° C
10	0	11	< 0,1	20
	2	224	n.b.*	36
	4	767	< 0,1	52
	6	2833	n.b.	93
	11	4718	< 0,1	222
15	25	5870	< 0,1	846
	45	5921	< 0,1	1090
	70	n.b.	< 0,1	1409
	101	n.b.	n.b.	1511
20	Höchste Thrombinaktivität pro 1 IE F II 118			22
	n.b.* = nicht bestimmt			

**Beispiel 5**

20 ml pasteurisiertes Prothrombinkonzentrat aus Rinderplasma mit 50 E F II/ml wurde mit 10 E/ml Rinderthrombin und 5 g Tri – Natrium – Citrat versetzt und bei 28 ° C inkubiert. Nach verschiedenen Zeiten wurde die erhaltene Thrombinaktivität bestimmt (Tabelle 2, Spalte a).

**Beispiel 6**

500 ml virusinaktiviertes Human – Prothrombinkonzentrat mit 75 E F II/ml wurde mit 15 E/ml Thrombin und 125 g Tri – Natrium – Citrat versetzt. Nach Einlösen des Salzes bei Raumtemperatur wurde die Lösung bei 4 ° C inkubiert. Nach verschiedenen Zeiten wurden Proben entnommen und die Thrombinaktivität bestimmt (Tabelle 1, Spalte a).

**Patentansprüche**

- Verfahren zur Herstellung einer gereinigten und virussicheren Thrombin – Präparation, dadurch gekennzeichnet, daß einer Lösung eines über einen Anionenaustauscher gereinigten und einer Virus – Inaktivierung unterworfenen Prothrombinkomplexes ein lösliches Salz mit einem Anion, das mit Calcium ein schwerlösliches Salz oder einen löslichen Komplex bildet, in einer Konzentration von mindestens 0.5 mol/l zugegeben und die Lösung mit einer katalytischen Menge Thrombin behandelt wird.
- Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß Thrombin in einer Konzentration von größer als Null bis 200, vorzugsweise 10 bis 50 Einheiten pro ml verwendet wird.
- Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß Prothrombinkomplex aus tierischem Plasma verwendet wird.
- Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß Prothrombinkomplex aus menschlichem Plasma verwendet wird.
- Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß bei 0 ° C bis 50 ° C, vorzugsweise bei 28 ° C, mit Thrombin behandelt wird.
- Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß ein über DEAE – Ionenaustauscher gereinigter Prothrombinkomplex verwendet wird.

7. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß das calciumbindende Anion Sulfat – , Citrat – , Phosphat – oder Oxalat – Anion ist.
8. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß das Salz in einer Konzentration von 0.5 bis zur jeweiligen Sättigungsgrenze verwendet wird.
9. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die katalytische Menge Thrombin während der Reinigung und/oder Virusinaktivierung des Prothrombinkomplexes erzeugt wird.
10. Verwendung einer nach mindestens einem der Ansprüche 1 – 8 hergestellten Thrombin – Präparation als Haemostyptikum oder in einem Gewebekleber auf der Basis von Fibrinogen.

15

20

25

30

35

40

45

50

55